

流動電位測定によるカリウムチャネルのイオン透過・選択機構の研究

研究代表者：岩本 真幸（医学部 形態機能医科学講座 分子生理学、助教）

電話：0776-61-8342、メールアドレス：iwamoto@u-fukui.ac.jp

概 要	
<p>イオンチャネル蛋白質が備える高いイオン透過効率とイオン選択性はどのように実現されているのか？このイオンチャネル研究の長年の課題に対し、本研究では新しい実験的アプローチを行った。イオンチャネル内をイオンに付随して水分子も同時に透過する現象に着目し、この際のイオンと水の透過比率を、流動電位と呼ばれる電気化学パラメータの測定を行い解析した。イオンー水透過比は、イオンチャネル結晶構造中に見られるイオンや水の分布よりも、実際の透過現象を多く反映した情報を提供する。従って、透過比の系統的な解析を行うことで生理的条件におけるイオン透過様式の検討が可能となる。本研究では新しい流動電位測定系を確立し、実際にカリウムチャネルにおけるイオンー水透過比を明らかにした。</p>	
関連キーワード	イオンチャネル、イオン透過、パッチクランプ、リポソーム、流動電位

研究の背景

イオンチャネルの多様な生理機能のいずれも、高いイオン透過効率とイオン選択性をチャネル蛋白質が兼ね備えることで実現されている。1秒間に100万個以上という効率でイオンを透過させ、その過程で特定のイオン種を厳密に選択する高度な分子機構は、イオンチャネル研究の長年の課題である。

近年、カリウムチャネルについて高分解能の結晶構造が報告され、イオン透過と密接に関連するチャネル蛋白質の構造が明らかになった。特に、イオン透過効率・選択性の鍵となる“選択性フィルター”と呼ばれる部位については、その内部のイオン分布が明らかにされた。これらの成果を受け、結晶構造を鋳型とした計算機シミュレーションによってイオン透過を再現する試みが急速に進められた。

しかし、結晶という“凍った”構造の中に生理

的条件下で起こるイオンの流れがどの程度反映されているのか不明確なことなど、構造情報のみに依存したイオン透過機構へのアプローチには多くの問題点が残る。一方、実験的アプローチの主流である単一チャネル電流測定は、透過するイオン種や透過速度などの情報は与えるが、チャネル蛋白質内での透過様式に関する情報には乏しい。従って、チャネル蛋白質内をイオンがどのような状態で流れるのかといった情報を得るには、新しい観点からの実験的アプローチが必要である。

本研究で着目した点は、チャネル蛋白質内ではイオン透過と水の透過が共役する現象である。このとき流動電位と呼ばれる電気化学パラメータを解析すれば、チャネル内を透過するイオンと水の比率という、イオン透過様式に直接関係する情報が得られる。

研究の目的

本研究では、高いイオン透過効率と選択性を実現するイオンチャネル蛋白質の分子機構の理解に向け、チャネル蛋白質内でのイオン透過様式を実験的アプローチにより検討したい。具体的には、カリウムチャネルの流動電位測定により、チャネル蛋白質内を透過するイオンと水の比率（イオン

ー水透過比）を解析する。イオンー水透過比は、チャネル蛋白質の結晶構造中に見られるイオンや水分子の分布よりも、実際の透過現象を多く反映している。この情報を系統的に集めることで、より現実的なイオン透過機構の検討を目指す。

研究の成果

1. 巨大一枚膜リボソームを用いた流動電位測定法の確立

イオンチャネルの流動電位測定はこれまで人工脂質平面膜を用いて行われてきた。しかし脂質平面膜への再構成が困難なチャネルが多く、実際に流動電位が測定された例は数少ない。本研究ではまず、流動電位測定の適用範囲を広げる目的で、巨大一枚膜リボソーム (GUV, 図 1 A) を用いた流動電位測定法の開発を試みた。測定試料には、結晶構造が高分解能で解かれている KcsA カリウムチャネルを用いた。KcsA を含むプロテオリボソームから調製した GUV に対しパッチクランプ法を適用し、電位コマンドと急速溶液置換 (図 1 B, C) による浸透圧パルスを同期させて与えた (図 2 A)。その結果、浸透圧パルスを与えている間は KcsA チャネルの逆転電位 (ゼロ電流電位) のわずかなシフトが観測された (図 2 B)。このシフトは、膜を介した水の駆動力 (浸透圧差) を与えることでチャネル内を水分子と共役してイオンが移動し、起電力 (流動電位) が生じたためと考えられる。

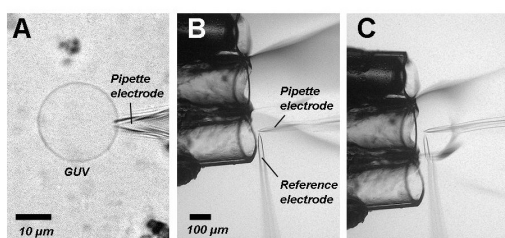


図 1. GUV を用いた流動電位測定

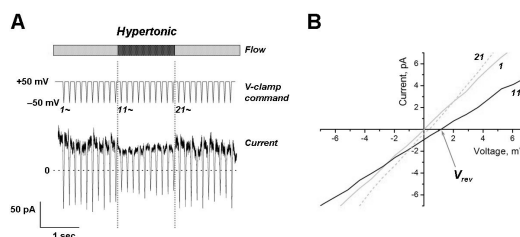


図 2. 電位コマンドと浸透圧パルスを与えた際の KcsA チャネル電流

2. カリウムチャネルのイオン透過におけるイオン-水透過比の解析

KcsA の逆転電位シフトを様々な大きさの浸透圧パルスを与えて測定した。浸透圧差とそれにより求まる流動電位の関係をプロットし、原点回帰直線の傾きからイオン-水透過比を求めた。その結果、200 mM のカリウム存在下では、カリウムと水分子が 1 : 1 の比率で KcsA 内を透過していることが明らかになった。これまでの結晶構造解析から、KcsA のイオン選択性フィルター内には 4 つのイオン結合部位があることがわかっている。本研究により明らかになった透過比率から、これら 4 つのイオン結合部位をカリウムと水が交互に移動していく透過モデルが示唆された。

特記事項・発表論文など

「特記事項」

本研究成果の学会発表

- 第 46 回日本生物物理学会年会, 2008.12, 福岡
“流動電位測定による KcsA カリウムチャネルのイオン透過機構の検討”, 岩本真幸, 清水啓史, 老木成稔
- Biophysical Society 53rd Annual Meeting, 2009.3, ボストン
“The water-ion coupling ratio for ion permeation through the KcsA potassium channel: Dependencies on concentration and species of permeating ions”, M. Iwamoto, H. Shimizu, S. Oiki

「本研究に関わる発表論文」

- “K チャネルのイオン透過機構：新しい流動電位測定法により明らかになったイオン-水流束比”, 老木成稔, 安藤博之, 久野みゆき, 清水啓史, 岩本真幸, *生物物理* **48**, 246-252 (2008)